Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse

Code K5005

4th edition/ 4ème édition/ 4. Ausgabe

For use with Dako automated immunostaining instruments.

The kit contains reagents sufficient for 500 tests.

Pour utilisation avec les automates de coloration Dako.

Ce kit contient les réactifs nécessaires pour 500 tests.

Zur Verwendung mit Dako Immunfärbeautomaten.

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausreichend für 500 Tests.

Contents/ Table des matières/ Inhalt

Page/ Page/ Seite

ENGLISH

Intended Use 4
Summary and Explanation 4
Reagents 5
A. Materials provided 5
B. Materials required but not provided 5
Precautions 6
Storage 7
Reagent Preparation 7
Specimen Collection and Preparation 7
Procedure 8
Quality Control 9
Interpretation of Results 9
Explanation of symbols 22

FRANÇAIS

Utilisation prévue 10
Résumé et explication 10
Réactifs 11
A. Matériels fournis 11
B. Matériels requis mais non fournis 12
Précautions 12
Conservation 13
Préparation des réactifs 13
Prélèvement et préparation des échantillons 14
Procédure 14
Contrôle qualité 15
Interprétation des résultats 15
Explication des symboles 22

DEUTSCH

Verwendungszweck 16
Zusammenfassung und Erklärung 16
Reagenzien 17
A. Mitgelieferte Materialien 17
B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material 18
Vorsichtsmaßnahmen 18
Aufbewahrung 19
Reagenzvorbereitung 19
Entnahme und Vorbereitung der Probe 19
Verfahren 20
Qualitätskontrolle 21
Auswertung der Ergebnisse 21
Erläuterung der Symbole 22

ENGLISH

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, is intended for use in immunohistochemistry together with Dako automated immunostaining instruments. The kit is based on the LSAB (labeled streptavidin-biotin) method and is employed in a three-step procedure. The first step is incubation of the tissue with an optimally diluted primary rabbit or mouse antibody, The second step is incubation with Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), and the third step is incubation with Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP). The reaction is visualized by a RED chromogen, which is also included in the kit. To ensure a proper staining it is recommended to use the kit in conjunction with other recommended reagents – listed in the section "Materials required but not provided".

Summary and Explanation

Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, has been designed to give an optimal staining on Dako automated immunostaining instruments, when using the templates/protocols advised in this package insert.

Prior to staining some routinely fixed, paraffin-embedded tissue sections should be subjected to heat-induced epitope retrieval (HIER) using the Target Retrieval Solution specified in the package insert for the primary antibody. Some primary antibodies require enzymatic pre-treatment of tissue for optimal staining instead of HIER. Please note that Dako REAL™ Proteinase K, code S2019, is designed to be used in combination with HIER in order to ease batch processing of the slides.

Endogenous alkaline phosphatase should be blocked by adding Levamisole (Bottle G) to the AP Substrate Buffer (Bottle F) prior to adding Chromogen Red 1, Red 2 and Red 3. Alternatively, the endogenous alkaline phosphatase can be blocked with Dako Dual Endogenous Enzyme Block, code S2003.

Due to an effective washing procedure and the presence of stabilizing proteins in the Dako reagents, extra blocking steps to reduce non-specific background staining are unnecessary.

Dako Wash Buffer specific for the individual Dako instruments is recommended.

Primary antibodies are not provided with the kit. We recommend the use of Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies or Dako concentrated Primary Antibodies.

Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, is based on an indirect streptavidin-biotin method, which has been shown to provide an increased sensitivity compared with analogous methods. The biotinylated secondary antibody reagent of the kit reacts equally well with rabbit and mouse immunoglobulins, thus only one secondary reagent is required for rabbit or mouse primary antibodies. The secondary antibody reagent has been optimally labeled with biotin using a 7-atom spacer arm. This allows each biotinylated antibody molecule to react with several alkaline phosphatase-conjugated streptavidin molecules and thereby increases the sensitivity of the detection system. The alkaline phosphatase-conjugated streptavidin of the kit is prepared from streptavidin isolated from *Streptomyces avidinii*, and alkaline phosphatase isolated from calf intestinal mucosa. The conjugation is performed by a refined two-step glutaraldehyde method. Because the isoelectric point of streptavidin is close to neutral, non-specific ionic interactions with specimen components are avoided. The biotinylated secondary antibody reagent as well as the alkaline phosphatase-conjugated streptavidin is provided as ready-to-use in dropper bottles and have to be poured into appropriate instrument containers before use.

The substrate system consists of four components: Chromogen Red 1, Chromogen Red 2, Chromogen Red 3, and an AP Substrate Buffer. The chromogen is a Fast Red-type chromogen. In addition concentrated Levamisole is provided to be added to the Substrate Working Solution if blocking of endogenous alkaline phosphatase is considered necessary. Before use, the Chromogen Red 1, Red 2 and Red 3 must be diluted in the AP Substrate Buffer. The substrate-chromogen produces a crisp red end product at the site of the target antigen.

Dako REAL™ Hematoxylin, code S2020, or Hematoxylin for the Dako Autostainer, code S3301 is recommended for counterstaining as they provide a clear blue, nuclear staining.

The stained tissue sections may be mounted with either aqueous or organic-solvent-based mounting medium.

Reagents

A. Materials provided

Bottle A

LINK, BIOTINYLATED SECONDARY ANTIBODIES (AB2)

Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)
100 mL, ready-to-use
Biotinylated goat anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulins. In buffered solution containing stabilizing protein and sodium azide. The color of this reagent may vary from strong yellow to colorless without having any influence on the performance of the kit.

Bottle B

STREPTAVIDIN ALKALINE PHOSPHATASE (AP)

Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)
100 mL, ready-to-use
Streptavidin conjugated to alkaline phosphatase. In buffered solution containing stabilizing protein and preservative.

Bottle C

CHROMOGEN RED 1 (X 28)

Dako REAL™ Chromogen Red 1
8 mL, 28x concentrated

Bottle D

CHROMOGEN RED 2 (X 28)

Dako REAL™ Chromogen Red 2
8 mL, 28x concentrated

Bottle E

CHROMOGEN RED 3 (X 28)

Dako REAL™ Chromogen Red 3
8 mL, 28x concentrated

Bottle F

AP SUBSTRATE BUFFER

Dako REAL™ AP Substrate Buffer
250 mL, ready-to-use
Buffered solution containing preservative

Bottle G

LEVAMISOLE (X 501)

Dako REAL™ Levamisole
1 mL, 501x concentrated
Buffered solution containing levamisole

B. Materials required but not provided

Dako automated immunostaining instruments

Dako Wash Buffer specific for the individual instrument

Dual Endogenous Enzyme Block, code S2003 (optional)

Dako REAL™ Proteinase K, code S2019, diluted in Dako REAL™ Proteinase K Diluent, code S2032, or Proteinase K (Ready-to-Use), code S3020 (if necessary)

N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies or suitably diluted concentrated primary rabbit or mouse antibodies from Dako

Dako REAL™ Antibody Diluent, code S2022 (for dilution of concentrated antibodies)

Dako REAL™ Hematoxylin, code S2020 or Hematoxylin for the Dako Autostainer, code S3301

Target Retrieval Solution. See package insert of the primary antibody

N-Series Ready-to-Use Rabbit or Mouse Universal Negative control or suitable negative control reagent for the primary antibody

Dako REAL™ Incubation Container, code S2030 (optional)

Dako REAL™ Slide Holder, code S2029 (optional)

Dako instrumentation utensils

Microscope slides

General laboratory reagents for dewaxing paraffin-embedded tissue sections

Mounting medium (aqueous or organic-solvent-based) and coverslips.

Precautions

1. For professional users.
2. Bottle A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) and Bottle B, Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP), contain material of mammalian origin. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
3. Bottle A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
4. The prepared Chromogen Working Solution must be applied within 20 minutes.
5. Do no expose Bottle C, Dako REAL™ Chromogen Red 1, Bottle D, Dako REAL™ Chromogen Red 2, Bottle E, Dako REAL™ Chromogen Red 3, Bottle G, Dako REAL™ Levamisole, or the Substrate Working Solution (CHROM) to strong light.
6. Bottle E, Dako REAL™ Chromogen Red 3, is very sensitive to heat and exposure to room temperature should therefore be as brief as possible.
7. Bottle E, Dako REAL™ Chromogen Red 3, contains 1–<5% Fast Red KL Salt, and is labeled: Toxic.
   R45 May cause cancer.
   S35 This material and its container must be disposed of in a safe way.
   S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show label where possible).
   S53 Avoid exposure – obtain special instructions before use.
   Restricted to professional users.
   Caution. This product contains a substance which has not yet been fully tested.
   The classification has been made solely on the basis of a comparison with substances with a similar structure.
   As a main rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper work procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Material Safety Data Sheet (MSDS) for additional information.
8. Bottle G, Dako REAL™ Levamisole, contains 1–<5 % levamisole hydrochloride, and is labeled: Harmful.
   R22 Harmful if swallowed.
   S60 This material and/or its container must be disposed of as hazardous waste.
9. Bottle F, Dako REAL™ AP Substrate Buffer, contains 1–<20 % trometamol. At product concentrations, trometamol does not require hazard labeling. Material Safety Data Sheet (MSDS) available for professional users on request.
10. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
11. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store the kit at 2–8 °C. Do not use after expiration date stamped on the kit. Do not interchange kit components from different lots. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. The prepared AP Substrate Buffer with Levamisole should be stored at 2–8 °C in the dark and used within 5 days. The Substrate Working Solution (CHROM) must be used within 20 minutes. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact our Technical Services.

Reagent Preparation

Substrate Working Solution **(CHROM)**
The Substrate Working Solution (CHROM) is prepared by mixing thoroughly 750 µL AP Substrate Buffer (Bottle F) with 30 µL Chromogen Red 1 (Bottle C), 30 µL Chromogen Red 2 (Bottle D) and 30 µL Chromogen Red 3 (Bottle E) in that exact order and with thorough mixing after the addition of each chromogen. **Use CHROM within 20 minutes**. This means that the Substrate Working Solution should be prepared and placed on the Dako automated immunostaining instrument no more than 20 minutes before the instrument applies the CHROM on the slides. Discard any volume of CHROM that is not used.

If endogenous alkaline phosphatase is expected to give unwanted unspecific staining, blocking can be achieved by adding Levamisole to the AP Substrate Buffer. Use Levamisole only if required. For those specimens that do require blocking of endogenous alkaline phosphatase, add 1 drop of Levamisole (Bottle G) to each 10 mL of AP Substrate Buffer (Bottle F). Add and mix before adding the Chromogen Red components. Use the AP Substrate Buffer with Levamisole within 5 days (store in the dark at 2–8 °C).

For the preparation of reagents not provided with the kit, please refer to the instructions included with the individual reagent.

Specimen Collection and Preparation

The specimens may be routinely fixed, paraffin embedded tissue sections and frozen tissue sections.

A variety of fixatives may be used for specimen preservation. Specimens should not be fixed in neutral buffered formalin for more than 24 hours and preferably for a shorter time.

The optimal thickness of paraffin-embedded sections is approximately 4 µm.

The optimal thickness of frozen sections is 4–6 µm.

The specimens should be mounted on microscope slides. The sections should be mounted on the slides as flat and wrinkle-free as possible. Too many wrinkles will have an impact on the staining results.

NOTE: The microscope slides must have a width suitable for the Dako instrument. Please refer to the Operator´s Manual for the individual Dako instrument for definition of usable microscope slides.

Paraffin sections should be mounted from a pre-heated water bath containing distilled or deionized water. The water bath should contain no additives (such as gelatin, poly-L-lysine etc.). Sections should be dried by heating, generally at a temperature not above 60 °C for a minimum of 60 minutes (e.g. overnight). To ensure proper adherence of sections to slides it is important to drain the water from beneath the sections prior to the oven drying process.

Procedure

Dako automated immunostaining instruments use techniques based on different principles to obtain an optimal staining result. Before running protocols on the Dako automated immunostaining instrument, please read carefully the **Operator's Manual for the dedicated Dako instrument.**

After deparaffinization and hydration to buffer (water), most tissue sections should need to be subjected to HIER. It is recommended to standardize the HIER in order to ascertain reproducible epitope retrieval. To standardize the treatment, it is recommended to load the slide holder fully with slides, even if only one slide may hold tissue; this ensures an identical heating of sections in every run. At the termination of the epitope retrieval step, slides must be left in the buffer for at least 20 minutes at room temperature. During this cooling, the Dako automated immunostaining instrument can be prepared for the staining run.

A few epitopes do not tolerate the HIER. Please refer to the package insert for the individual Dako primary antibody for instructions.

Incubation with primary antibody

Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies can be used with Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections.

A dilution guideline for Dako concentrated primary antibodies and the use of proteinase K pre-treatment in connection with Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections is provided in the package insert of the concentrated primary antibody.

The concentrated primary antibodies should be diluted in Dako REAL™ Antibody Diluent, code S2022.

The slides are loaded onto a Dako instrument and stained using the dedicated template/protocol for Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, code K5005. If the template/protocol is not present on your Dako instrument, please contact our Technical Services.

Before using Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, on the Dako Autostainer for the first time it is necessary to add the reagents and times listed in table 1 to the reagent list of the instrument.

Table 1. Necessary additions to the reagent list and optimal incubation times

Reagent	**Code**	**Suggestion for short name**	**Template step**	**Incubation Time**
Dual Endogenous Enzyme Block (optional)	S2003	DEEB	End. Enz. Block	5 minutes
Dako REAL™ Proteinase K Solution or Dako Proteinase K	S2019 + S2032 S2030	Pro K	Pre-treatment under antibody	10 minutes
Primary antibodies	Individual	-	Antibody	10*-25 minutes
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)	K5005	K5005LIN	Secondary Reagent	15 minutes
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED Strepavidin Alkaline Phosphatase (AP)	K5005	K5005AP	Tertiary Reagent	15 minutes
Dako REAL™ Detection System, Chromogen (RED)	K5005	K5005LPR	Substrate-Batch	20 minutes
Dako REAL™ Hematoxylin Or Dako Hematoxylin for the Dako Autostainer	S2020 S3301	-	Auxiliary	1-2 minutes 1-5 minutes
Blueing Buffer (= Autostainer Buffer)	S 3006	-	Auxiliary	5 minutes

* N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies

For other Dako instruments the reagent names and incubation times are included in the templates/protocols.

Quality Control

Each staining run should include a known positive control specimen to ascertain a proper performance of all the applied reagents. If the positive control specimen fails to demonstrate positive staining, labeling of test specimens should be considered invalid.

A negative control reagent should be used with each specimen to identify any non-specific staining. If non-specific staining cannot be clearly differentiated from the specific staining, the labeling of the test specimen should be considered invalid.

Negative Control for N-Series Rabbit Primary Antibodies, code N1699, or Negative Control for N-Series Mouse Primary Antibodies, code N1698, is recommended as negative control reagent.

Interpretation of Results

The Substrate Working Solution (CHROM) gives a red color at the site of the target antigen recognized by the primary antibody. The red color should be present on the positive control specimen at the expected localization of the target antigen. If non-specific staining is present, this will be recognized as a rather diffuse, red staining on the slides treated with the negative control reagent. Nuclei will be stained blue by the hematoxylin counterstain.

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*.

Le système de détection Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse est destiné à être utilisé en immunohistochimie avec les automates de coloration Dako. La trousse est basée sur la méthode streptavidine-biotine encore appelée LSAB (Labeled Streptavidin-Biotin) et est utilisée dans le cadre d'une procédure à trois étapes. La première étape consiste en une incubation du tissu avec un anticorps primaire de lapin ou de souris dilué de façon optimale ; la deuxième étape est une incubation avec l'anticorps secondaire de liaison biotinylé Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) ; enfin la troisième étape est une incubation avec le produit Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP). La réaction est visualisée grâce à un chromogène ROUGE, qui est également inclus dans la trousse. Pour garantir une bonne coloration, il est recommandé d'utiliser cette trousse en association avec d'autres réactifs recommandés – figurant à la section « Matériels requis mais non fournis ».

Résumé et explication

Le système de détection Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse a été conçu pour offrir une coloration optimale sur les automates de coloration Dako lors de l'utilisation des modèles/protocoles conseillés dans cette notice.

Avant de procéder à la coloration, certaines coupes de tissus fixés en routine et inclus en paraffine doivent être soumises à une procédure de démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) à l'aide de la solution de démasquage des cibles spécifiée dans la notice de l'anticorps primaire. Certains anticorps primaires nécessitent un prétraitement enzymatique du tissu pour une coloration optimale au lieu d'une procédure HIER. Veuillez noter que le produit Dako REAL™ Proteinase K, réf. S2019, est conçu pour être utilisé en association avec une procédure HIER de façon à faciliter le traitement des séries de lames.

La phosphatase alcaline endogène doit être bloquée en ajoutant du Lévamisole (flacon G) au tampon substrat AP Substrate Buffer (flacon F), et ceci avant l'ajout des chromogènes Chromogen Red 1, Red 2 et Red 3. Une autre option pour bloquer cette phosphatase alcaline endogène est d'utiliser le produit Dako Dual Endogenous Enzyme Block, réf. S2003.

En raison d'une procédure de lavage efficace et de la présence de protéines stabilisantes dans les réactifs Dako, des étapes de blocage supplémentaires ne sont pas nécessaires pour réduire la coloration de fond non spécifique.

Il est recommandé d'utiliser le tampon de lavage Dako spécifique à chaque appareil Dako.

Les anticorps primaires ne sont pas fournis dans la trousse. L'utilisation des anticorps Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies ou des anticorps primaires concentrés Dako est recommandée.

Le système de détection Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse est basé sur une méthode streptavidine-biotine indirecte, laquelle s'est avérée fournir une augmentation de la sensibilité en comparaison avec d'autres méthodes analogues. Le réactif d'anticorps secondaire biotinylé de la trousse réagit de la même manière avec les immunoglobulines de lapin et avec les immunoglobulines de souris ; un seul réactif secondaire étant ainsi nécessaire pour les anticorps primaires de lapin ou de souris. Le réactif d'anticorps secondaire a été marqué de manière optimale avec de la biotine en utilisant un bras espaceur de 7 atomes. Ceci permet à chaque molécule d'anticorps biotinylé de réagir avec plusieurs molécules de streptavidine conjuguée à de la phosphatase alcaline et, par conséquent, d'augmenter la sensibilité du système de détection. La streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline de la trousse est préparée à partir de streptavidine issue de *Streptomyces avidinii*, et de phosphatase alcaline isolée à partir de muqueuse intestinale de veau. La conjugaison est réalisée selon une méthode au glutaraldéhyde à deux étapes. Étant donné que le point isoélectrique de la streptavidine est proche de la neutralité, des interactions ioniques non spécifiques avec les composants des échantillons sont évitées. Le réactif d'anticorps secondaire biotinylé ainsi que la streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline sont fournis prêts à l'emploi dans des flacons compte-gouttes et doivent être transvasés dans des récipients appropriés de l'appareil avant utilisation.

Le système du substrat est formé de quatre composants : Chromogen Red 1, Chromogen Red 2, Chromogen Red 3 et un tampon substrat AP Substrate Buffer. Le chromogène est un chromogène de type Fast Red. De plus, du lévamisole concentré est fourni pour être ajouté à la solution de travail du substrat au cas où il serait nécessaire de bloquer la phosphatase alcaline endogène. Avant emploi, les chromogènes Chromogen Red 1, Red 2 et Red 3 doivent être dilués dans du tampon AP Substrate Buffer. Le substrat chromogène forme un produit rouge vif sur le site de l'antigène cible.

Les produits Dako REAL™ Hematoxylin, réf. S2020, ou Hematoxylin for the Dako Autostainer, réf. S3301, sont recommandés pour la contre-coloration car ils fournissent une coloration bleu clair des noyaux.

Les coupes de tissus colorées peuvent être montées soit avec un milieu de montage aqueux, soit avec un milieu de montage organique à base de solvant.

Réactifs

A. Matériels fournis

Flacon A

LINK, BIOTINYLATED SECONDARY ANTIBODIES (AB2)

Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)
100 mL, prêt à l'emploi
Immunoglobulines de chèvre anti-souris et anti-lapin biotinylées. Dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et de l'azide de sodium. La couleur de ce réactif peut varier de jaune foncé à incolore, sans que cela n'ait aucune influence sur la performance de la trousse.

Flacon B

STREPTAVIDIN ALKALINE PHOSPHATASE (AP)

Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)
100 mL, prêt à l'emploi
Streptavidine conjuguée à de la phosphatase alcaline. Dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur.

Flacon C

CHROMOGEN RED 1 (X 28)

Dako REAL™ Chromogen Red 1
8 mL, concentré 28x

Flacon D

CHROMOGEN RED 2 (X 28)

Dako REAL™ Chromogen Red 2
8 mL, concentré 28x

Flacon E

CHROMOGEN RED 3 (X 28)

Dako REAL™ Chromogen Red 3
8 mL, concentré 28x

Flacon F

AP SUBSTRATE BUFFER

Dako REAL™ AP Substrate Buffer
250 mL, prêt à l'emploi
Solution tamponnée contenant un agent conservateur

Flacon G

LEVAMISOLE (X 501)

Dako REAL™ Levamisole
1 mL, concentré 501x
Solution tamponnée contenant du lévamisole

B. Matériels requis mais non fournis

Automates de coloration Dako

Tampon de lavage Dako spécifique à chaque appareil

Dual Endogenous Enzyme Block (Agent bloquant double des enzymes endogènes), réf. S2003 (facultatif)

Dako REAL™ Proteinase K, réf. S2019, diluée dans le diluant Dako REAL™ Proteinase K Diluent, réf. S2032, ou Proteinase K (Ready-to-Use), réf. S3020 (le cas échéant)

Anticorps N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies ou anticorps primaires de lapin ou de souris concentrés dilués de façon appropriée provenant de chez Dako

Dako REAL™ Antibody Diluent, réf. S2022 (pour la dilution des anticorps concentrés)

Dako REAL™ Hematoxylin, réf. S2020 ou Hematoxylin for the Dako Autostainer, réf. S3301

Solution de démasquage des cibles. Consulter la notice de l'anticorps primaire

N-Series Ready-to-Use Rabbit or Mouse Universal Negative Control ou réactif de contrôle négatif approprié pour l'anticorps primaire

Bac d'incubation Dako REAL™ Incubation Container, réf. S2030 (facultatif)

Portoir de lames Dako REAL™ Slide Holder, réf. S2029 (facultatif)

Ustensiles pour l'appareil Dako

Lames de microscope

Réactifs généraux de laboratoire pour le déparaffinage des coupes de tissus inclus en paraffine

Milieu de montage (aqueux ou organique à base de solvant) et lamelles.

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Le flacon A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) et le flacon B, Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP), contiennent des substances d'origine animale. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
3. Le flacon A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), contient de l'azide de sodium (NaN_3), un produit chimique hautement toxique sous sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. La solution de travail du chromogène doit être appliquée dans les 20 minutes suivant sa préparation.
5. Ne pas exposer le flacon C, Dako REAL™ Chromogen Red 1, le flacon D, Dako REAL™ Chromogen Red 2, le flacon E, Dako REAL™ Chromogen Red 3, le flacon G, Dako REAL™ Levamisole ou la solution de travail du substrat (CHROM) à une lumière vive.
6. Le flacon E, Dako REAL™ Chromogen Red 3, est très sensible à la chaleur ; son exposition à la température ambiante doit donc être aussi brève que possible.
7. Le flacon E, Dako REAL™ Chromogen Red 3, contient de 1 % à moins de 5 % de sel Fast Red KL et est désigné comme : Toxique.
   R45 Peut provoquer le cancer.
   S35 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes les précautions d'usage.
   S45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).
   S53 Éviter l'exposition – se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation.
   Réservé aux utilisateurs professionnels.
   Attention. Ce produit contient une substance qui n'a pas encore été complètement testée.

Cette classification a été effectuée uniquement d'après une comparaison avec des substances ayant une structure similaire.
En règle générale, il n'est pas permis aux personnes âgées de moins de 18 ans de manipuler ce produit. Les utilisateurs doivent être informés sur les bonnes procédures de travail, les propriétés dangereuses du produit et les instructions de sécurité nécessaires. Veuillez vous reporter à la fiche technique de sécurité (MSDS) pour plus d'informations.

8. Le flacon G, Dako REAL™ Levamisole, contient de 1 % à moins de 5 % d'hydrochlorure de lévamisole et est désigné comme :
   Nocif.
   R22 Nocif en cas d'ingestion.
   S60 Éliminer le produit et/ou son récipient comme un déchet dangereux.
9. Le flacon F, Dako REAL™ AP Substrate Buffer, contient de 1 % à moins de 20 % de trométamol. Aux concentrations du produit, le trométamol ne nécessite pas qu'on le désigne comme produit dangereux. Une fiche technique de sécurité (MSDS) est disponible sur demande pour les utilisateurs professionnels.
10. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
11. Les solutions inutilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver la trousse entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur la trousse. Ne pas intervertir les composants de la trousse entre différents lots. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles qui sont indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Le tampon AP Substrate Buffer contenant du Lévamisole doit être conservé dans l'obscurité entre 2 et 8 °C et utilisé dans les 5 jours suivant sa préparation. La solution de travail du substrat (CHROM) doit être utilisée dans les 20 minutes suivant sa préparation. En cas de coloration inattendue, ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et de suspicion d'un problème avec le produit, contacter notre service technique.

Préparation des réactifs

Solution de travail du substrat **(CHROM)**
La solution de travail du substrat (CHROM) est préparée en mélangeant soigneusement 750 µL de tampon AP Substrate Buffer (flacon F) à 30 µL de Chromogen Red 1 (flacon C), 30 µL de Chromogen Red 2 (flacon D) et 30 µL de Chromogen Red 3 (flacon E), en suivant exactement cet ordre et en n'oubliant pas de mélanger soigneusement après l'ajout de chaque chromogène. **Utiliser le CHROM dans les 20 minutes.** Ceci signifie que la solution de travail du substrat doit être préparée et placée sur l'automate de coloration Dako pas plus de 20 minutes avant que l'appareil ne commence l'application du CHROM sur les lames. Jeter toute solution de CHROM inutilisée.

Si la phosphatase alcaline endogène est susceptible de donner une coloration non spécifique indésirable, le blocage peut être obtenu en ajoutant du Lévamisole au tampon AP Substrate Buffer. Utiliser du Lévamisole uniquement si cela est nécessaire. Pour les échantillons qui nécessitent un blocage de la phosphatase alcaline endogène, ajouter 1 goutte de Lévamisole (flacon G) à chaque 10 mL de tampon AP Substrate Buffer (flacon F). Ajouter et mélanger avant l'ajout des composants du chromogène rouge. Utiliser le tampon AP Substrate Buffer contenant du Lévamisole dans les 5 jours (conserver dans l'obscurité entre 2 et 8 °C).

Pour la préparation des réactifs qui ne sont pas fournis avec la trousse, veuillez vous reporter aux instructions incluses avec chaque réactif.

Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons peuvent être des coupes de tissus fixés en routine et inclus en paraffine et des coupes de tissus congelées.

Divers fixateurs peuvent être utilisés pour la conservation des échantillons. Les échantillons ne doivent pas être fixés dans du formol tamponné neutre pendant plus de 24 heures et de préférence pendant une période plus courte.

L'épaisseur optimale des coupes incluses en paraffine est d'environ 4 µm.

L'épaisseur optimale des coupes congelées est de 4 à 6 µm.

Les échantillons doivent être montés sur des lames de microscope. Les coupes doivent être montées sur les lames aussi plates que possible et avec le moins de plis possible. Trop de plis aura un impact sur les résultats de la coloration.

REMARQUE : Les lames de microscope doivent posséder une largeur adaptée à l'appareil Dako. Veuillez vous reporter au manuel de l'opérateur de chaque appareil Dako pour la définition des lames de microscope utilisables.

Les coupes en paraffine doivent être montées depuis le bain-marie préchauffé contenant de l'eau distillée ou déionisée. Le bain-marie ne doit contenir aucun additif (tel que de la gélatine, de la poly-L-lysine, etc.). Les coupes doivent être séchées en les chauffant, en général à une température ne dépassant pas 60 °C et pendant 60 minutes au minimum (pendant une nuit par exemple). Pour garantir une bonne adhérence des coupes aux lames, il est important d'égoutter l'eau se trouvant sous les coupes avant de passer à la procédure de séchage dans une étuve.

Procédure

Les automates de coloration Dako utilisent des techniques basées sur différents principes afin d'obtenir un résultat de coloration optimal. Avant d'exécuter des protocoles sur l'automate de coloration Dako, veuillez lire attentivement le **Manuel de l'opérateur spécifique à l'appareil Dako**.

Après le déparaffinage et l'hydratation par tampon (eau), la plupart des coupes de tissus devraient nécessiter une procédure HIER. Il est recommandé de standardiser la procédure HIER de façon à garantir un démasquage d'épitopes reproductible. Pour standardiser le traitement, il est recommandé de charger complètement le portoir de lames avec des lames, même s'il est possible qu'une seule lame contienne un tissu ; cela assure un chauffage identique des coupes dans chaque cycle. À la fin de l'étape de démasquage d'épitopes, les lames doivent être maintenues dans le tampon pendant au moins 20 minutes à température ambiante. Durant ce refroidissement, l'automate de coloration Dako peut être préparé pour le cycle de coloration.

Quelques épitopes ne tolèrent pas la procédure HIER. Veuillez vous reporter à la notice de chaque anticorps primaire Dako pour des instructions.

Incubation avec l'anticorps primaire

Les anticorps Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies peuvent être utilisés avec le système de détection Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, appliqué sur des coupes fixées au formol et incluses en paraffine.

Une directive de dilution pour les anticorps primaires concentrés Dako et l'utilisation du prétraitement à la protéinase K en connexion avec le système de détection Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, appliquée sur des coupes fixées au formol et incluses en paraffine, est fournie dans la notice de l'anticorps primaire concentré.

Les anticorps primaires concentrés doivent être dilués dans le diluant Dako REAL™ Antibody Diluent, réf. S2022.

Les lames sont chargées sur un appareil Dako et colorées à l'aide du modèle/protocole indiqué pour le système de détection Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, réf. K5005. Si le modèle/protocole n'est pas présent sur votre appareil Dako, veuillez contacter notre service technique.

Avant d'utiliser le système de détection Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse pour la première fois sur l'automate de coloration Dako Autostainer, il est nécessaire d'ajouter les réactifs et les temps figurant au tableau 1 à la liste de réactifs de l'appareil.

Tableau 1. Ajouts nécessaires à la liste de réactifs et temps d'incubation optimaux

Réactif	**Réf.**	**Abréviation suggérée**	**Étape du modèle**	**Temps d'incubation**
Dual Endogenous Enzyme Block (facultatif)	S2003	DEEB	Blocage enzyme endogène	5 minutes
Dako REAL™ Proteinase K Solution ou Dako Proteinase K	S2019 + S2032 S2030	Pro K	Prétraitement sous anticorps	10 minutes
Anticorps primaires	Individuel	-	Anticorps	10*–25 minutes
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)	K5005	K5005LIN	Réactif secondaire	15 minutes
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED Strepavidin Alkaline Phosphatase (AP)	K5005	K5005AP	Réactif tertiaire	15 minutes
Dako REAL™ Detection System, Chromogen (RED)	K5005	K5005LPR	Substrat-Série	20 minutes
Dako REAL™ Hematoxylin ou Dako Hematoxylin for the Dako Autostainer	S2020 S3301	-	Auxiliare	1–2 minutes 1–5 minutes
Blueing Buffer (= tampon pour l'automate de coloration Autostainer)	S3006	-	Auxiliare	5 minutes

* Anticorps N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies

Pour les autres appareils Dako, les noms des réactifs et les temps d'incubation sont inclus dans les modèles/protocoles.

Contrôle qualité

Chaque cycle de coloration doit comprendre un échantillon de contrôle positif connu pour vérifier la bonne performance de tous les réactifs appliqués. Si l'échantillon de contrôle positif ne présente pas de coloration positive, le marquage des échantillons à analyser doit être considéré comme non valide.

Un réactif de contrôle négatif doit être utilisé avec chaque échantillon afin d'identifier toute coloration non spécifique. Si une coloration non spécifique ne peut pas être clairement différenciée de la coloration spécifique, le marquage de l'échantillon à analyser doit être considéré comme non valide.

Les anticorps Negative Control for N-Series Rabbit Primary Antibodies, réf. N1699, ou Negative Control for N-Series Mouse Primary Antibodies, réf. N1698, sont recommandés comme réactif de contrôle négatif.

Interprétation des résultats

La solution de travail du substrat (CHROM) produit une couleur rouge sur le site de l'antigène cible reconnu par l'anticorps primaire. La couleur rouge doit être présente sur l'échantillon de contrôle positif là où l'antigène cible est attendu. Si une coloration non spécifique est présente, ceci sera identifié comme une coloration rouge diffuse sur les lames traitées avec le réactif de contrôle négatif. Les noyaux seront colorés en bleu par le contre-colorant hématoxyline.

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse ist für immunhistochemische Verfahren mit Dako-Immunfärbeautomaten bestimmt. Das auf der LSAB-Methode (markiertes Streptavidin-Biotin) beruhende Kit wird in einem Drei-Schritt-Verfahren eingesetzt. Zuerst wird das Gewebe mit einem optimal verdünnten primären Kaninchen- oder Mausantikörper, danach mit Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) und zuletzt mit Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP) inkubiert. Die Reaktion wird mit dem ebenfalls im Kit enthaltenen RED Chromogen sichtbar gemacht. Um korrekte Färbeergebnisse zu gewährleisten, wird empfohlen, das Kit nur mit empfohlenen Reagenzien zu verwenden – siehe Abschnitt „Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material“.

Zusammenfassung und Erklärung

Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse wurde so konzipiert, dass bei Verwendung der in dieser Packungsbeilage angegebenen Matrizes/Protokolle optimale Färbeergebnisse mit Dako-Immunfärbeautomaten erzielt werden.

Vor der Färbung sollte für einige routinemäßig fixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) mit der in der Packungsbeilage des primären Antikörpers angegebenen Demaskierungslösung erfolgen. Bei einigen primären Antikörpern werden bessere Färbeergebnisse erzielt, wenn anstelle des HIER-Verfahrens eine Gewebevorbehandlung mit Enzymen vorgenommen wird. Bitte beachten, dass für das HIER-Verfahren Dako REAL™ Proteinase K, Code-Nr. S2019 vorgesehen ist, um die Batch-Verarbeitung von Objektträgern zu erleichtern.

Die endogene alkalische Phosphatase sollte durch Zugabe von Levamisole (Fläschchen G) zu AP Substrate Buffer (Fläschchen F) blockiert werden, bevor Chromogen Red 1, Red 2 und Red 3 zugegeben werden. Wahlweise kann die endogene alkalische Phosphatase auch mit Dako Dual Endogenous Enzyme Block, Code-Nr. S2003 blockiert werden.

Das wirkungsvolle Waschverfahren und die in den Dako-Reagenzien vorhandenen stabilisierenden Proteine machen weitere Blockierungsschritte zur Verminderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung überflüssig.

Es wird empfohlen, den speziellen Dako Waschpuffer für das jeweilige Dako-Gerät zu verwenden.

Primäre Antikörper gehören nicht zum Lieferumfang. Wir empfehlen Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies bzw. konzentrierte primäre Antikörper von Dako.

Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse beruht auf einem indirekten Streptavidin-Biotin-Verfahren, das eine nachweislich höhere Empfindlichkeit als analoge Verfahren aufweist. Das den biotinylierten sekundären Antikörper enthaltende Reagenz reagiert gleich gut mit den Immunglobulinen von Kaninchen und Maus, so dass für primäre Kaninchen- oder Mausantikörper nur ein einziges Sekundärreagenz erforderlich ist. Das sekundäre Antikörper-Reagenz wurde mit Hilfe eines Spacerarms aus 7 Atomen optimal mit Biotin markiert. Dadurch wird die Empfindlichkeit des Detektionssystems erhöht, denn jedes biotinylierte Antikörper-Molekül kann mit mehreren mit alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidin-Molekülen reagieren. Das mit alkalischer Phosphatase konjugierte Streptavidin im Kit wurde aus Streptavidin, das aus *Streptomyces avidinii* isoliert wurde, sowie aus alkalischer Phosphatase aus der Schleimhaut des Kalbsdarms gewonnen. Die Konjugation erfolgt nach einem verfeinerten Zweischritt-Glutaraldehydverfahren. Da der isoelektrische Punkt des Streptavidins nahezu neutral ist, kommt es nicht zu unspezifischen Wechselbeziehungen zwischen den Ionen der Probenkomponenten. Der biotinylierte sekundäre Antikörper sowie das mit alkalischer Phosphatase konjugierte Streptavidin werden gebrauchsfertig in Tropffläschchen geliefert und müssen vor Gebrauch in die entsprechenden Behälter des Geräts eingefüllt werden.

Das Substratsystem besteht aus vier Komponenten: Chromogen Red 1, Chromogen Red 2, Chromogen Red 3 und AP Substrate Buffer. Bei dem Chromogen handelt es sich um ein Fast Red-Chromogen. Außerdem wird konzentriertes Levamisol mitgeliefert, das zur Substrat-Arbeitslösung hinzugefügt werden kann, falls eine Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase als notwendig erachtet wird. Chromogen Red 1, Red 2 und Red 3 müssen vor Gebrauch mit AP Substrate Buffer verdünnt werden. Das Substratchromogen führt zu einem kontrastreichen roten Endprodukt am Ort des Zielantigens.

Für die Gegenfärbung werden Dako REAL™ Hematoxylin, Code-Nr. S2020 oder Hematoxylin for the Dako Autostainer, Code-Nr. S3301 empfohlen, da sie eine deutliche nukleäre Blaufärbung hervorrufen.

Für die Fixierung der gefärbten Gewebeschnitte eignen sich sowohl Fixiermittel auf wässriger Basis als auch auf Basis organischer Lösungsmittel.

Reagenzien

A. Mitgelieferte Materialien

Fläschchen A

LINK, BIOTINYLATED SECONDARY ANTIBODIES (AB2)

Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)
100 mL, gebrauchsfertig
Biotinylierte Ziege-Anti-Maus- und Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobuline. In gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Natriumazid.
Farbschwankungen bei diesem Reagenz (kräftig gelb bis farblos) haben keinerlei Einfluss auf die Leistung des Kits.

Fläschchen B

STREPTAVIDIN ALKALINE PHOSPHATASE (AP)

Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)
100 mL, gebrauchsfertig
An alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin. In gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Konservierungsmittel.

Fläschchen C

CHROMOGEN RED 1 (X 28)

Dako REAL™ Chromogen Red 1
8 mL, 28fach konzentriert

Fläschchen D

CHROMOGEN RED 2 (X 28)

Dako REAL™ Chromogen Red 2
8 mL, 28fach konzentriert

Fläschchen E

CHROMOGEN RED 3 (X 28)

Dako REAL™ Chromogen Red 3
8 mL, 28fach konzentriert

Fläschchen F

AP SUBSTRATE BUFFER

Dako REAL™ AP Substrate Buffer
250 mL, gebrauchsfertig
Gepufferte Substratlösung mit Konservierungsmittel

Fläschchen G

LEVAMISOLE (X 501)

Dako REAL™ Levamisole
1 mL, 501fach konzentriert
Gepufferte Levamisol-Lösung

B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material

Dako-Immunfärbeautomaten

Spezielle Dako-Waschpuffer für das jeweilige Gerät

Dual Endogenous Enzyme Block, Code-Nr. S2003 (optional)

Dako REAL™ Proteinase K, Code-Nr. S2019, verdünnt in Dako REAL™ Proteinase K Diluent, Code-Nr. S2032 oder Proteinase K (Ready-to-Use), Code-Nr. S3020 (soweit erforderlich)

N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies oder entsprechend verdünnte konzentrierte primäre Kaninchen- bzw. Mausantikörper von Dako.

Dako REAL™ Antibody Diluent, Code-Nr. S2022 (zur Verdünnung konzentrierter Antikörper)

Dako REAL™ Hematoxylin, Code-Nr. S2020 oder Hematoxylin for the Dako Autostainer, Code-Nr. S3301

Demaskierungslösung. Siehe Packungsbeilage des primären Antikörpers.

N-Series Ready-to-Use Rabbit oder Mouse Universal Negative Control oder ein anderes geeignetes Negativkontrollreagenz für den primären Antikörper.

Dako REAL™ Incubation Container, Code-Nr. S2030 (optional)

Dako REAL™ Slide Holder, Code-Nr. S2029 (optional)

Zubehör für Dako-Geräte

Mikroskop-Objektträger

Für die Wachsentfernung bei paraffineingebetteten Gewebeschnitten gebräuchliche Laborreagenzien

Fixiermittel (wässrig oder auf Basis organischer Lösungsmittel) und Deckgläser

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Fläschchen A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) und Fläschchen B, Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP) enthalten von Säugetieren stammendes Material. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
3. Fläschchen A, Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
4. Angesetzte Chromogen-Arbeitslösung innerhalb von 20 Minuten verbrauchen.
5. Fläschchen C, Dako REAL™ Chromogen Red 1, Fläschchen D, Dako REAL™ Chromogen Red 2, Fläschchen E, Dako REAL™ Chromogen Red 3, Fläschchen G, Dako REAL™ Levamisole sowie die Substrat-Arbeitslösung (CHROM) keinem starken Lichteinfall aussetzen.
6. Der Inhalt von Fläschchen E, Dako REAL™ Chromogen Red 3 ist höchst wärmeempfindlich und sollte daher nur so kurz wie möglich auf Zimmertemperatur gebracht werden.
7. Fläschchen E, Dako REAL™ Chromogen Red 3 enthält 1–<5 % Fast Red KL Salz und ist folgendermaßen markiert:
   Giftig.
   R45 Kann Krebs erzeugen.
   S35 Abfälle und Behälter müssen auf sichere Weise entsorgt werden.
   S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
   S53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
   Nur für Fachpersonal bestimmt.
   Vorsicht. Dieses Produkt enthält eine Substanz, die noch nicht vollständig erforscht wurde. Die Klassifizierung ist ausschließlich auf der Grundlage eines Vergleichs mit Substanzen ähnlicher Struktur erfolgt.

Personen unter 18 Jahren dürfen mit diesem Produkt grundsätzlich nicht arbeiten. Alle Anwender müssen sorgfältig in das richtige Arbeitsverfahren, die gefährlichen Eigenschaften des Produkts und die notwendigen Sicherheitsmaßnahmen eingewiesen werden. Weitere Informationen bitte dem Material-Sicherheitsdatenblatt (MSDS) entnehmen.

8. Fläschchen G, Dako REAL™ Levamisole enthält 1–<5 % Levamisolhydrochlorid und ist folgendermaßen markiert:
   Gesundheitsschädlich.
   R22 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
   S60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
9. Fläschchen F, Dako REAL™ AP Substrate Buffer enthält 1–<20 % Trometamol. Bei dieser Konzentration ist für Trometamol keine Gefahrenkennzeichnung erforderlich. Auf Anfrage ist für Fachpersonal ein Material-Sicherheitsdatenblatt (Material Safety Data Sheet, MSDS) erhältlich.
10. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
11. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Aufbewahrung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Kit aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Kitkomponenten aus unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Werden die Reagenzien anders als unter den genannten Bedingungen aufbewahrt, sind die Bedingungen vom Anwender zu validieren. Den fertigen AP Substrate Buffer mit Levamisole im Dunkeln bei 2–8 °C aufbewahren und innerhalb von 5 Tagen verbrauchen. Angesetzte Substrat-Arbeitslösung (CHROM) innerhalb von 20 Minuten verbrauchen. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Produkt hindeutet, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

Reagenzvorbereitung

Substrat-Arbeitslösung **(CHROM)**
Die Substrat-Arbeitslösung (CHROM) wird angesetzt, indem 750 µL AP Substrate Buffer (Fläschchen F) mit 30 µL Chromogen Red 1 (Fläschchen C), 30 µL Chromogen Red 2 (Fläschchen D) und 30 µL Chromogen Red 3 (Fläschchen E) in genau dieser Reihenfolge zugegeben werden; nach Zusatz jedes einzelnen Chromogens gründlich mischen. **CHROM innerhalb von 20 Minuten verbrauchen.** Das bedeutet, dass die Substrat-Arbeitslösung frühestens 20 Minuten, bevor das Gerät die CHROM-Lösung auf die Objektträger aufbringt, angesetzt und in den Dako-Immunfärbeautomaten gefüllt werden darf. Nicht verwendete CHROM-Lösung entsorgen.

Wird erwartet, dass endogene alkalische Phosphatase eine unerwünschte unspezifische Färbung hervorruft, kann die Blockade durch Zugabe von Levamisole zu AP Substrate Buffer erfolgen. Levamisole nur im Bedarfsfall verwenden. Zu allen Proben, bei denen eine Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase erforderlich ist, 1 Tropfen Levamisole (Fläschchen G) für je 10 mL AP Substrate Buffer (Fläschchen F) zugeben. Vor Zugabe der Chromogen Red Komponenten zugeben und mischen. AP Substrate Buffer mit Levamisole innerhalb von 5 Tagen verbrauchen (im Dunkeln bei 2–8 °C aufbewahren).

Angaben zum Ansetzen von Reagenzien, die nicht zum Lieferumfang des Kits gehören, bitte den jeweiligen Gebrauchsanweisungen entnehmen.

Entnahme und Vorbereitung der Probe

Geeignet sind routinemäßig fixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte und Gefrierschnitte.

Für die Konservierung der Proben sind verschiedene Fixiermittel geeignet. Die Proben sollten höchstens 24 Stunden (vorzugsweise kürzer) in neutral gepuffertem Formalin fixiert werden.

Die optimale Dicke paraffineingebetteter Schnitte beträgt etwa 4 µm.

Bei Gefrierschnitten liegt die optimale Dicke bei 4–6 µm.

Die Proben auf Mikroskop-Objektträgern fixieren. Die Schnitte sind so flach und faltenfrei wie möglich auf den Objektträgern zu fixieren. Zu viele Falten wirken sich negativ auf die Färbungsergebnisse aus.

HINWEIS: Die Größe der Objektträger muss zum Dako-Gerät passen. Angaben zu geeigneten Mikroskop-Objektträgern bitte dem Bedienungshandbuch des jeweiligen Dako-Geräts entnehmen.

Paraffineingebettete Schnitte sollten aus einem vorgewärmten Wasserbad mit destilliertem oder entionisiertem Wasser heraus fixiert werden. Dieses Wasserbad darf keine Zusätze enthalten (wie z.B. Gelatine, Poly-L-Lysin usw.). Die Schnitte werden mindestens 60 Minuten lang (z.B. über Nacht) wärmegetrocknet, gewöhnlich bei einer Temperatur von höchstens 60 °C. Damit die Schnitte gut auf den Objektträgern haften, muss vor dem Trockenprozess im Ofen alles Wasser unter den Schnitten entfernt worden sein.

Verfahren

Um optimale Färbungsergebnisse zu erzielen, arbeiten Dako-Immunfärbeautomaten mit auf verschiedenen Prinzipien beruhenden Verfahren. Das **Bedienerhandbuch des betreffenden Dako-Geräts** vor der Durchführung von Färbungen mit Dako-Immunfärbeautomaten gründlich durchlesen.

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung mit Puffer (Wasser) sollte bei den meisten Gewebeschnitten ein HIER-Verfahren durchgeführt werden. Um eine reproduzierbare Demaskierung zu gewährleisten, wird eine Standardisierung des HIER-Verfahrens empfohlen. Zur Standardisierung der Behandlung sollte die Objektträger-Halterung komplett mit Objektträgern beladen werden, auch wenn sich nur auf einem Objektträger Gewebe befindet; hierdurch wird eine einheitliche Erwärmung der Schnitte bei jedem Durchlauf gewährleistet. Nach dem Demaskierungs-Arbeitsschritt müssen die Objektträger mindestens 20 Minuten lang bei Raumtemperatur in der Pufferlösung verbleiben. Während dieser Abkühlphase können die Dako-Immunfärbeautomaten für den Färbedurchlauf vorbereitet werden.

Einige wenige Epitope dürfen nicht mit dem HIER-Verfahren behandelt werden. Angaben bitte der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers von Dako entnehmen.

Inkubation mit dem primären Antikörper

Dako N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies können mit Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden.

Die Packungsbeilage des jeweiligen konzentrierten primären Antikörpers enthält Angaben zur Verdünnung konzentrierter primärer Antikörper von Dako und zur Vorbehandlung mit Proteinase K in Verbindung mit Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitten.

Die konzentrierten primären Antikörper sollten mit Dako REAL™ Antibody Diluent, Code-Nr. S2022 verdünnt werden.

Ein Dako-Gerät wird mit den Objektträgern beladen, die unter Zugrundelegung der jeweiligen Matrix/des jeweiligen Protokolls für Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, Code-Nr. K5005 gefärbt werden. Sollte auf Ihrem Dako-Gerät keine Matrix/kein Protokoll vorhanden sein, setzen Sie sich bitte mit unserem Technischen Kundendienst in Verbindung.

Vor der ersten Verwendung von Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse auf dem Dako-Autostainer müssen die in Tabelle 1 angegebenen Reagenzien und Inkubationszeiten in die Reagenzienliste des Geräts aufgenommen werden.

Tabelle 1. Notwendige Ergänzungen der Reagenzienliste und optimale Inkubationszeiten

Reagenz	**Code-Nr.**	**Vorschlag Kurzbezeichnung**	**Matrix-Schritt**	**Inkubations-zeit**
Dual Endogenous Enzyme Block (optional)	S2003	DEEB	End. Enz. Block	5 Minuten
Dako REAL™ Proteinase K Solution oder Dako Proteinase K	S2019 + S2032 S2030	Pro K	Vorbehandlung unter Antikörper	10 Minuten
Primäre Antikörper	Individuell	-	Antikörper	10*–25 Minuten
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)	K5005	K5005LIN	Sekundäres Reagenz	15 Minuten
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)	K5005	K5005AP	Tertiäres Reagenz	15 Minuten
Dako REAL™ Detection System, Chromogen (RED)	K5005	K5005LPR	Substrat-Charge	20 Minuten
Dako REAL™ Hematoxylin oder Dako Hematoxylin for the Dako Autostainer	S2020 S3301	-	Zusatz	1–2 Minuten 1–5 Minuten
Blueing Buffer (= Autostainer-Puffer)	S3006	-	Zusatz	5 Minuten

* N-Series Ready-to-Use Primary Antibodies

Für andere Geräte von Dako sind die Namen der Reagenzien und die zugehörigen Inkubationszeiten bereits in den Matrizes/Protokollen enthalten.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Färbedurchlauf sollte eine als positiv bekannte Kontrollprobe mitgeführt werden, um die Leistung aller verwendeten Reagenzien zu bestätigen. Wenn das positive Kontrollgewebe keine Färbung aufweist, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.

Zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung sollte ferner stets eine Negativkontrolle mitlaufen. Ist die unspezifische Färbung nicht eindeutig von der spezifischen Färbung zu unterscheiden, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.

Als Negativkontrolle werden Negative Control for N-Series Rabbit Primary Antibodies, Code-Nr. N1699, oder Negative Control for N-Series Mouse Primary Antibodies, Code-Nr. N1698 empfohlen.

Auswertung der Ergebnisse

Die Substrat-Arbeitslösung (CHROM) erzeugt am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens ein kontrastreiches rotes Endprodukt. Die Rotfärbung muss am erwarteten Ort des Zielantigens auf der Positivkontrolle vorhanden sein. Eine unspezifische Färbung stellt sich als eher diffuse Rotfärbung der mit der Negativkontrolle behandelten Objektträger dar. Zellkerne werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	2 °C 8 °C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	Use by Utiliser avant Verwendbar bis	T Toxic Toxique Giftig
IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	Σ Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	Manufacturer Fabricant Hersteller	
Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	LOT Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	Xn Harmful Nocif Gesundheitsschädlich	

Produced by/ Produit par/ Hersteller:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Denmark/ Danemark/ Dänemark
Tel. +45 44 85 95 00
Fax +45 44 85 95 95